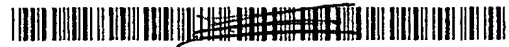


(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 6 月 28 日 (28.06.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/46469 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12Q 1/68
(21) 国際出願番号: PCT/JP00/09144
(22) 国際出願日: 2000 年 12 月 22 日 (22.12.2000)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ:
特願平 11/363869
1999 年 12 月 22 日 (22.12.1999) JP
特願平 11/363871
1999 年 12 月 22 日 (22.12.1999) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒101-8535 東京都千代田区神田司町2-9 Tokyo (JP).
(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 木下盛敏 (KI-NOSHITA, Moritoshi) [JP/JP]; 〒771-1265 徳島県板野郡藍住町住吉字神蔵 16-7 Tokushima (JP). 石田祐介 (ISHIDA, Yusuke) [JP/JP]; 〒771-1330 徳島県板野郡上板町西分字馬道南2-11 Tokushima (JP). 久保木真 (KUBOKI, Makoto) [JP/JP]; 〒703-8236 岡山県岡山市国富974-1-101 Okayama (JP).
(74) 代理人: 有賀三幸, 外 (ARUGA, Mitsuyuki et al.); 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル Tokyo (JP).
(81) 指定国 (国内): CA, US.
(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).
添付公開書類:
— 国際調査報告書
2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

Requires determination of sequence
Don't require primer specific to
5' end of HCV-1.

(54) Title: METHOD OF JUDGING HEPATITIS C VIRUS GENOTYPE

(54) 発明の名称: C型肝炎ウイルスの遺伝子型の判定方法

(57) Abstract: A method of judging hepatitis C virus genotype characterized by determining the bases at least at the 167-, 163- and 161-positions of the 5'-NCR of HCV gene and then judging the genotype 1 and subtypes 2a, 2b and 3a on the basis of the base data thus obtained; a primer comprising the base sequence represented by SEQ ID NO:1; and a method of judging hepatitis C virus genotype for providing data concerning the amount of HCV-RNA and the genotype thereof in a specimen which is characterized by involving the following steps: (a) the step of amplifying the 5'-NCR of hepatitis C virus gene by the PCR method and quantifying the hepatitis C virus-RNA; and (b) the step of determining the base sequence of the PCR amplification product obtained in the above step (a) and judging the hepatitis C virus-RNA genotype.

[続葉有]

BEST AVAILABLE COPY



(57) 要約:

本発明は、H C V 遺伝子の 5' - N C R の少なくとも - 1 6 7 位、1 6 3 位及び - 1 6 1 位の塩基を決定し、当該塩基情報に基づいて遺伝子型のタイプ 1 並びにサブタイプ 2a, 2b 及び 3a を判定することを特徴とする C 型肝炎ウィルスの遺伝子型判別方法、配列番号 1 の塩基配列からなるプライマー、及び献体中の H C V - R N A 量とその遺伝子型の情報を与えるための方法であって、(イ) C 型肝炎ウィルス遺伝子の 5' - N C R を P C R 法によって増幅し、C 型肝炎ウィルス - R N A 量を定量する工程、(ロ) 工程 (イ) で調整された P C R 増幅産物の塩基配列を決定し、C 型肝炎ウィルス - R N A の遺伝子型を判定する工程、を含むことを特徴とする C 型肝炎ウィルスの遺伝子型判別方法などに関する。

明 細 書

C型肝炎ウイルスの遺伝子型の判定方法

技術分野

本発明は、C型肝炎ウイルス (Hepatitis C virus、以下「HCV」と略記する) の遺伝子型の判定方法に関する。

背景技術

HCVには遺伝子変異が高頻度に認められ (顕著な塩基多様性を示し)、遺伝子配列の違いに基づく型分類が行われている。現在、これらの遺伝子型は、HCVを大きく1型から6型までの6つの遺伝子型に分類し、更にサブタイプとしてa、b、c等を附記して表記されており (P. Simmonds, et al., Journal of General Virology, 74, 661-668 (1993))、世界に広く分布する代表的な遺伝子型としては、1a、1b、2a、2b及び3aの5つの遺伝子型が知られている。

近年、肝炎患者の血清中HCV-RNAゲノムの検出は、HCV感染の直接的証明となるとともにウイルス増殖のマーカーとして臨床上有用であるとされ、最近の研究では、インターフェロンによるHCV治療の効果予測として、患者血清中のHCV-RNA量とともにこの遺伝子型の情報が、その指標として重要視されている。

また、HCVの遺伝子型を判定すれば、各型毎の肝炎の進行程度や肝硬変、肝癌への移行率、症状の特徴等に関する解析が可能になり、予後の予測や治療の指針とすることができ、更には感染経路の解明にも利用することができる。従って、HCVの遺伝子型に関する判定は、診断、治療、予後の予測の上で極めて重要である。

従来、HCVの型判定方法としては、岡本等により、HCVのコア領域を標的として7種のプライマーを作成し、これらのプライマーを組合せ、逆転写酵素を用いたRT-PCRを実施し、得られた遺伝子産物のサイズから型を判定する方法が(H. Okamoto, et al., Journal of General Virology, 73, 673-679 (1992))、茶山等らにより、HCVのNS5領域を選び同様にして型を判定する方法が報告されている(茶山一彰等「肝臓」、33巻、805-806頁、1992年)。

更に、HCVの5'非翻訳領域(以下「5'-NCR」と略記する)の遺伝子増幅産物を制限酵素により切断して型の判定を行う試み(F. McOmish, et al., Transfusion, 33, 7-13 (1993); 特開平9-75100号公報等)や、同増幅産物を直接塩基配列決定して得られる塩基情報に基づいての判定方法(Germer J. J., et al., J. Clin. Microbiol., 37(8), 2625-2630 (1990); Holland J., et al., Pathology, 30(2), 192-195 (1998); Doglio A., et al., Res. Virol., 149(4), 219-227 (1998))等も報告されている。

しかしながら、上記報告された各種のHCV遺伝子型の判定方法は、その判定精度、判定効率、操作の煩雑さ、判定に要する時間、コスト等において、尚十分に満足できるものではなく、新しいHCV遺伝子型の判定方法の確立をはじめ、临床上HCVを簡易・迅速に測定できる方法の開発が望まれている。

発明の開示

本発明の目的は、上記要望に合致する改良されたHCV遺伝子型の判定方法を提供することにある。

本発明者らは、斯かる実状に鑑み、多数の患者血清について、HCV-RNAの定性的又は定量的測定法においてPCR増幅されている領域の一つである5'-NCRの塩基配列を決定し、これらを遺伝子型判定のアルゴリズム作成のデータベースとしたところ、5'-NCRの塩基配列の特定位置の数個の塩基がHCV遺伝子型に特異的であり、特定位置の少なくとも3つの塩基情報(-16

7 位、-163 位及び-161 位) によって、HCV 遺伝子型のタイプ 1 並びにサブタイプ、2 a、2 b 及び 3 a が確実に判定でき、更に-99 位の塩基情報を参照すればサブタイプ 1 a 及び 1 b をも判定できると共に、臨床検体中の HCV-RNA の定量と遺伝子型の判定を簡便な操作及び短時間で同時に行うことができることを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、HCV 遺伝子の 5' -NCR の少なくとも-167 位、-163 位及び-161 位の塩基を決定し、当該塩基情報に基づいて遺伝子型のタイプ 1 並びにサブタイプ、2 a、2 b 及び 3 a を判定することを特徴とする HCV の遺伝子型判定方法を提供するものである。

また本発明は、C 型肝炎ウイルス遺伝子の 5' -NCR の少なくとも-99 位、-167 位、-163 位及び-161 位の塩基を決定し、当該塩基情報に基づいて遺伝子型のサブタイプ 1 a、1 b、2 a、2 b 及び 3 a を判定することを特徴とする C 型肝炎ウイルスの遺伝子型判定方法を提供するものである。

また本発明は、配列番号 1 の塩基配列からなるプライマーを提供するものである。

また本発明は、検体中の HCV-RNA 量とその遺伝子型の情報を与えるための方法であって、以下の工程 (イ) ~ (ロ) :

(イ) HCV 遺伝子の 5' -NCR を PCR 法によって増幅し、HCV-RNA 量を定量する工程、

(ロ) 工程 (イ) で調製された PCR 増幅産物を精製する工程、及び

(ハ) 工程 (ロ) で精製された PCR 増幅産物の塩基配列を決定し、HCV-RNA の遺伝子型を判定する工程、

を含むことを特徴とする HCV の遺伝子型判定方法を提供するものである。

更に本発明は、C 型肝炎患者から採取された C 型肝炎ウイルスを含むサンプルを用いて、以下の工程 (イ) ~ (ロ) :

(イ) C 型肝炎ウイルス遺伝子の 5' -NCR を PCR 法によって増幅し、C 型

肝炎ウイルス－RNA量を定量する工程、

(ロ) 工程 (イ) で調製されたPCR増幅産物を精製する工程、及び

(ハ) 工程 (ロ) で精製されたPCR増幅産物の塩基配列を決定し、C型肝炎ウイルス－RNAの遺伝子型を判定する工程、

を行うことを特徴とする当該C型肝炎患者におけるインターフェロン治療効果の予測方法を提供するものである。

発明を実施するための最良の形態

本明細書において、アミノ酸、ペプチド、塩基配列、核酸、制限酵素、その他に関する略号による表示は、IUPAC及びIUPAC－IUBによる命名法又はその規定、及び「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(平成9年3月、特許庁調整課審査基準室)に従うものとする。

また、本発明におけるHCV遺伝子の5'－NCRの塩基配列は、HCV遺伝子型1bの代表例として、国立遺伝学研究所核酸データベース(DDBJ)に登録されているK-14(DDBJ D31602)を基準とし、その翻訳領域の開始コドン(ATG)におけるAを0番目として、このAの直前の5'－NCRにおける塩基を－1番目とし、これを基点に5'上流側に向かって、連続する負の番号を付して示すものである。

本発明によれば、上記の通り、HCV遺伝子の5'－NCRにおける特定位置(即ち、－167位、－163位及び－161位)のわずか3つの塩基及び所望により更に－99位の塩基を同定するのみで、HCV遺伝子型を正確に判定することができる。また、上記4ヶ所に加えて更に、同5'－NCRにおける他の塩基情報、好ましくは、－159位、－155位、－132位、－128位、－124位、－122位及び－119位からなる群から選ばれる少なくとも1つの塩基情報を参照すれば、よりの確にHCV遺伝子型を判定できる。

本発明者が確認した上記HCV遺伝子の5'－NCRにおける特定位置と、

HCV遺伝子型との関連は、下記表1に示されるとおりである。

表1

遺伝子型 位置	タイプ1	2 a	2 b	3 a
-167	T	T	T	C
-163	A	G	G	G
-161	G	G	A	G
-159	C/T	A	A	T
-155	C	T	T	C
-132	G	A	A	G
-128	A/T	T	T	A
-124	C/G	C	T	C
-122	C/G/T	C	C	C
-119	A/G	C/T	T	G
-99	G/A	-	-	-

上記表1に示されるとおり、HCVの5' -NCRの-167番目がT、
-163番目がA及び-161番目がGである場合は、HCV遺伝子型はタイプ
1と同定できる。これは更に-159番目がC又はT、-155番目がC、
-132番目がG、-128番目がA又はT、-124番目がC又はG、
-122番目がC、G又はT及び-119番目がA又はGである塩基情報の少な
くとも1つを参照することができる。更に当該タイプ1のサブタイプ（1 a及び
1 b）を同定するには、-99番目の塩基情報を参照すればよく、当該塩基がG
である場合には、サブタイプ1 bと同定することができ、またAである場合には
実質的にサブタイプ1 aと同定できる。

同-167番目がT、-163番目がG及び-161番目がGである場合は、
HCV遺伝子型は2 aと同定できる。これは更に-159番目がA、-155番

目がT、-132番目がA、-128番目がT、-124番目がC、-122番目がC及び-119番目がC又はTである塩基情報の少なくとも1つを参照することができる。

同-167番目がT、-163番目がG及び-161番目がAである場合は、HCV遺伝子型は2bと同定できる。これは更に-159番目がA、-155番目がT、-132番目がA、-128番目がT、-124番目がT、-122番目がC及び-119番目がTである塩基情報の少なくとも1つを参照することができる。

同-167番目がC、-163番目がG及び-161番目がGである場合は、HCV遺伝子型は3aと同定できる。これは更に-159番目がT、-155番目がC、-132番目がG、-128番目がA、-124番目がC、-122番目がC及び-119番目がGである塩基情報の少なくとも1つを参照することができる。

本発明のHCVの遺伝子型判定方法は、上記の通りHCV遺伝子の5'-NCRの特定位置の塩基情報を指標とするものであるが、型別判定に用いられる遺伝子の調製やその塩基配列の決定のための手法等には何ら限定はなく、公知又は将来得られ得る各種の方法を広く採用することができる。

本発明におけるHCVの遺伝子型の判定は、以下に示す工程(イ)～(ハ)により行うことができる。

(イ) PCR増幅産物の調製

遺伝子型判定に供される遺伝子は、RT-PCR法等により検体中のHCV-RNAの5'-NCR領域が増幅されたPCR増幅産物が用いられる。斯かるPCR増幅産物は、HCVの5'-NCRの全領域に対応する塩基長を与えるものであってもよいが、本発明のHCVの遺伝子型判定に利用できる塩基情報を含むもの、すなわち少なくとも塩基番号-167～-161位、好ましくは-167～-99位を含むDNA断片(部分DNA)であれば特に限定されるも

のではない。尚、R T - P C Rは、常法に従い行うことができ（例えば前記した既知判定方法に係る文献等参照）、H C Vの5' - N C Rの特定位置を含む適当な標的領域を特異的に増幅するように適宜設定したプライマーを利用して行えばよい。

このようなP C R増幅産物の調製には、既知のH C V - R N A定量測定において用いられている方法がそのまま利用でき、これを用いれば本発明のH C V遺伝子型判定に利用するための所望のP C R増幅産物が調製できると共に、検体中のH C V - R N A量を測定できることから、特に有用である。

H C V - R N Aの定量法は、H C Vの5' - N C RをP C R増幅産物とするものであればその手法等には何ら限定はなく、公知又は将来得られ得る各種の方法を広く採用することができる。

本発明のH C Vの遺伝子型判定方法に使用できるH C V - R N Aの定量的測定法としては、例えば「アンプリコア™ H C Vモニター（C型肝炎ウイルス（H C V）R N A測定用）」（ロシュ・ダイアグノスティックス社）、「アンプリコア™ H C Vモニター v 2. 0（C型肝炎ウイルス（H C V）R N A測定用）」（ロシュ・ダイアグノスティックス社）等の測定キットが挙げられ、後者キットを用いた定量では、定量に際して、H C Vの5' - N C Rの- 2 7 4番から- 3 1番の塩基配列からなる所望のP C R増幅産物が調製される。

このように、上記測定キットによるH C V - R N A定量測定に際して調製されるP C R増幅産物は、本発明のH C V遺伝子型の判定に極めて良好に利用することができ、その利用は、調製の簡便さはもとより、H C V - R N A量とその遺伝子型判定の両者情報を同時に得ることができる点で、極めて有用である。

尚、上記H C V - R N A定量的測定法に際して調製されるP C R増幅産物は、所望により、これを鋳型として、その一部領域を増幅するようにその領域内に適宜設定したプライマーを利用して更にP C R増幅することができる。

（ロ）P C R増幅産物の精製

次に、PCRにより増幅された遺伝子産物は、常法、例えばガラス担体を用いる通常のカラムクロマトグラフィー等の精製工程に付し、精製される。

当該精製工程においては、例えばGFXCカラム（アマシャムファルマシア社）、セントリセップスピンカラム（PEバイオシステムズ社）、セントリスピン20カラム（プリンストンセパレーション社）等の市販の精製用カラムの利用を好適に例示できる。

（ハ）塩基配列の決定と遺伝型の判定

次に、精製されたPCR増幅産物についてその塩基配列を決定し、前述した方法により、遺伝子型の判定が行われる。

塩基配列決定のための手法は、本発明判定方法にかかる特定の塩基情報が得られる限りにおいて何ら限定はなく、該手法としては、公知又は将来得られ得る各種の方法を広く採用することができ、好ましくは、それに利用されるシークエンサーが一般に広く採用されていることより、任意のシークエンシング用プライマーを用いる直接塩基配列決定法（例えばサイクルシークエンシング法；服部正平、「PCRを用いた直接塩基配列決定法」実験医学（増刊）新PCRとその応用、29-35頁（1997）、羊土社等）に従い実施することができる。

ここで、シークエンシング用プライマーは、本発明にかかる特定の塩基情報が得られるように設定したものである限り特に限定はなく、PCR増幅産物の領域から任意に設定することができる。当該プライマーとして特に好ましいものとしては、HCV 5'-NCRの-210番～-189番に対応する配列番号1の塩基配列からなるプライマー（「geno7」と命名）を例示することができる。このプライマーgeno7は、遺伝子型を判定することのできる塩基多様性を含む5'-NCRにおいてどの遺伝子型のHCV-RNAとも反応でき、これを利用すれば配列決定が極めて良好に実施できる。例えば後述の実施例では、配列決定に供した全ての被検サンプルを例外なく配列決定できている。

尚、本発明HCVの遺伝子型判定方法において用いられる検体は、特に限定さ

れるものではなく、例えば被験者から採取されたHCVを含むサンプル、すなわち各種生体試料が用いられ、臨床上の指標としては、血清等の血液サンプルが好ましい。

また、本発明において採用され得る各種の操作、例えば、RNAの抽出、DNA又はDNA断片の合成、切断、削除、付加又は結合を目的とする酵素処理、RNA又はDNAの単離、精製、複製、選択、増幅などはいずれも常法に従うことができる（分子遺伝学実験法、共立出版（株）1983年発行；PCRテクノロジー、宝酒造（株）1990年発行等参照）。またこれらは必要に応じて適宜常法に従い修飾して用いることもできる。

かくして、本発明のHCVの遺伝子型判定方法を用いれば、簡便な操作及び短時間で、検体中のHCVの遺伝子型を判定することができ、また同時にHCV-RNA量を測定することができる。一方、C型肝炎患者の血清中HCV-RNA量及びHCVの遺伝子型とインターフェロンによるC型肝炎の治療効果には、血清中HCV-RNA量の少ない症例では著効例が多く、また1b型は2aや2b型に比し無効例が多いという事例が報告されていることから（「インターフェロン療法の実際」、C型肝炎の最新ガイド、（株）南江堂、1994年）、本発明方法を用いて血清中HCV-RNA量とHCV遺伝子型を同時に一連の操作で測定すれば、C型肝炎患者におけるインターフェロンによる治療効果が予測でき、個々の患者に合った適切な治療を行うことが可能となる。

実施例

以下、本発明の内容を実施例を用いて具体的に説明する。但し、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

実施例1 HCV-RNAの5'-NCRの塩基配列ライブラリー

(1) プライマーの調製

本例において用いたプライマー（geno7、geno5及びgeno6）の塩基配列をそれ

ぞれ配列番号1、2及び3に示す。

プライマーgeno7は、シーケンシング用であり、HCV-RNAのコア蛋白のイニシエーションコドンATGのAを0番とした時の-210番から-189番の配列に相当する。

プライマーgeno5及びgeno6は、PCR用であり、それぞれ同-271番から-252番及び同-64番から-43番の配列に相当する。

(2) サンプルの調製

岡本法（「スマイテストHCVジェノタイプ」（株）特殊免疫研究所）でHCV-RNAの遺伝子型を決定しておいた57例の患者血清のHCV-RNA量を、HCV-RNA定量的測定法キット「アンプリコア™ HCVモニターv2.0（C型肝炎ウイルス（HCV）RNA測定用）」（ロシュ・ダイアグノスティックス社）を用いて、同キット操作法に従い定量した。

上記測定キットは、HCVの5'-NCRの-274番から-31番の配列からなる244bpのPCR産物を与えるものであり、この測定済みPCR産物溶液を利用して以下被検サンプルを調製した。

PCR産物は、GFXカラム（GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification: アマシャム・ファルマシア社）を用いて精製した。

即ち、GFXカラムに同キット添付のコレクションチューブをセットし、同キット添付のキャプチャー緩衝液500μlをカラムに加えた後、「アンプリコア™ HCVモニターv2.0」で測定済みのPCR産物溶液60μlを加えて、4～6回ピペッティングにより攪拌した。このGFXカラムをコレクションチューブをセットしたまま15,000rpmで30秒間遠心し、コレクションチューブに溶出される溶液を取り除いた。再度コレクションチューブをセットし、同キット添付のウォッシュ緩衝液500μlをGFXカラムに加え、15,000回転/分で30秒間遠心し、コレクションチューブに溶出される溶液ごとコレクションチューブを廃棄した。次にGFXカラムに1.5mlサンプルチューブを

セットし、1 mM EDTAを含む10 mMトリス緩衝液 (pH8.0) の20 μ lをGFXカラムに加え、室温に1分間放置した後、15,000回転/分で1分間遠心して、1.5 mlサンプルチューブに溶出してくるPCR産物を回収した。

回収したPCR産物の1 μ lを取り、3%アガロースゲルにて電気泳動し、エチウムブロミド染色にて244 bpのPCR産物のバンドを確認した。

ここでバンドが確認された場合には、回収したPCR産物を被検サンプルとして後述のシーケンシング反応に供した。

一方、244 bpのバンドが確認されない場合には、シーケンシング反応に供するPCR産物が不足していると考えられるため、geno5プライマーとgeno6プライマーによるPCR増幅を行った。即ち、「アンプリコア™ HCVモニター v2.0」のPCR産物溶液の2 μ lに、10×PCR緩衝液（アドバンスドバイオテクノロジー社）2 μ l、10 mM dNTPs 溶液（パーキン・エルマー社）1.6 μ l、25 mM MgCl₂（アドバンスドバイオテクノロジー社）1.2 μ l、10 pmol/ μ lのgeno5プライマー溶液0.8 μ l、10 pmol/ μ lのgeno6プライマー溶液0.8 μ l及び「Thermostable DNAポリメラーゼ」（アドバンスドバイオテクノロジー社）0.5 Uを加え、総容量20 μ lとして94℃、3分間の後、94℃、30秒間、56℃、30秒間、72℃、90秒間のサイクルを35サイクル行い、次いで72℃、10分間反応させた。

かくして得たPCR産物の全量をGFXカラムにて同様に精製し、被検サンプルとしてシーケンシング反応に供した。

(3) シーケンシング（塩基配列の決定）

シーケンシング反応は、geno7プライマーによる直接塩基配列決定法（サイクルシーケンシング法）に従い行った。

即ち、前記サンプル（PCR産物）の2 μ lに、「BigDye Terminator Rmix」（パーキン・エルマー社）4 μ lと3.2 pmol/ μ lのgeno7プライマー

溶液0.5 μ l 及び滅菌蒸留水を加えて総容量10 μ l として、96℃、30秒間、50℃、30秒間、60℃、4分間のサイクルを35サイクル行った。シーケンシング反応後、反応液に脱イオン化ホルムアミド色素液を加えて、ABI 377自動シーケンサー（パーキン・エルマー社）にて塩基配列を決定した。

（４）HCVの5' -NCRの塩基配列データベースと型判定

①上記57例の患者サンプルのHCV遺伝子は、岡本法で1b、2a及び2b型の3種であった。これらサンプルのHCVの5' -NCRの塩基配列情報を、遺伝子型決定のための遺伝子型判定アルゴリズム作成にデータベースとして供した。

尚、3a型は、既存のHCV株の配列情報（GenBank No. HCV6311, HCV6318及びHCV6323）を利用した。

当該データベースを注意深く観察することにより、HCVの5' -NCRの-167番目、-163番目及び-161番目の塩基は、これらHCVの1b、2a、2b及び3aの各遺伝子型で共通しており、この3カ所の塩基情報に基づけば、これら遺伝子型間の区別乃至同定が可能であることがわかった。

即ち、HCV-RNAの1b型では、HCVの5' -NCRの-167番目が「T」、-163番目が「A」及び-161番目が「G」であった。

HCV-RNAの2a型では、HCVの5' -NCRの-167番目が「T」、-163番目が「G」及び-161番目が「G」であった。

HCV-RNAの2b型では、HCVの5' -NCRの-167番目が「T」、-163番目が「G」及び-161番目が「A」であった。

HCV-RNAの3a型では、HCVの5' -NCRの-167番目が「C」、-163番目が「G」及び-161番目が「G」であった。

②上記患者サンプルではサブタイプ1aは存在しておらず、1bとの型判定につき検討した。即ち、岡本法でHCV遺伝子型が1a又は1bと判定された血友病患者の血清を用いて、実施例1に従い、HCVの5' -NCRの塩基配列情報を

得た。

その結果、HCV-RNAの1 a型は、HCVの5'-NCRの-167番目が「T」、-163番目が「A」及び-161番目が「G」であり、前記したHCV-RNAの1 b型の結果に一致した。また、1 a型の全11例において、-99番目の塩基は全例が「A」であった。

以上より、HCVの5'-NCRの-167位、-163位、-161位及び-99位の塩基情報に基づき、HCV-RNAのタイプとサブタイプの区別乃至同定が可能であることがわかった。

即ち、HCVの5'-NCRの-167番目が「T」、-163番目が「A」及び-161番目が「G」である場合には、HCV-RNAのタイプ1と同定することができる。

更にこのタイプ1において、-99番目が「G」である場合には、HCV-RNAの1 b型と同定することができ、また、これが「A」である場合には（約5%程度の僅かの例外を除き）実質的に1 a型と同定することができる。

実施例2 HCV型判定

C型肝炎患者の血清を用いて、実施例1に従い、HCV遺伝子型の判定を行った。

即ち、「アンプリコア™ HCVモニターv 2.0」でウイルス量を定量した患者血清からのサンプルにつき、そのHCVの5'-NCRの塩基配列を決定し、実施例1で示した塩基情報に基づく型判定を行った。

実施例1の57例を含む全290サンプルについてのHCV-RNA量の測定結果と遺伝子型判定結果は次のとおりである。

290サンプルのうち284例についてHCV-RNA量の定量が可能であり、被験者におけるウイルス量が把握できた。当該定量法のPCR産物を利用することにより、この290サンプル全てにおいて、そのHCVの5'-NCRの塩基配列の決定が可能であった。

以上によれば、被験者におけるHCV-RNA量とその遺伝子型の両者情報を極めて簡単に得ることができ、これは、当該被験者におけるインターフェロン治療効果の予測に臨床上極めて有用である。

尚、上記における遺伝子型判定結果は次に示すとおりである。

(タイプ1) :

タイプ1と判定された例数は220例であり、これらは岡本法での型判定結果(全例が1bであった)に一致していた。これら全例において、-167番目の塩基は「T」、-163番目の塩基は「A」及び-161番目の塩基は「G」であった。

-159番目の塩基は「C」として特徴付けられた(但し、8例で「T」が、3例で「C」及び「T」の両者が検出された)。

-155番目の塩基は「C」として特徴付けられた。

-132番目の塩基は「G」として特徴付けられた。

-128番目の塩基は「A」として特徴付けられた(但し、1例で「T」が同時に検出された)。

-124番目の塩基は「C」として特徴付けられた(但し、1例で「G」が同時に検出された)。

-122番目の塩基は「T」として特徴付けられた(但し、「C」又は「G」が各1例で同時に検出された)。

-119番目の塩基は「A」として特徴付けられた(但し、2例で「G」が同時に検出された)。

(1a及び1b型) :

上記タイプ1と判定された220例において、岡本法での型判定ではいずれも1b型と判定され1a型と判定されたサンプルはなかった。

尚、この220例及び前記した血友病患者サンプル例における-99番目の塩基は次のとおりであった。

1 a 型全 11 例において、－ 99 番目の塩基は「A」として特徴付けられた。

1 b 型全 320 例において、－ 99 番目の塩基は「G」として特徴付けられた（但し、5% 弱の 16 例において「A」が検出された）。

（2 a 型）：

2 a 型と判定された例数は 42 例であり、これら全例において、－ 167 番目の塩基は「T」、－ 163 番目の塩基は「G」及び－ 161 番目の塩基は「G」であった。

これら 42 例中 41 例は、岡本法での型判定結果と一致していた。不一致例は、岡本法で（1 b + 2 a）混合型とされた 1 例であり、本発明の判定方法ではその主要なタイプ（2 a 型）を判定していると考えられる。

－ 159 番目の塩基は「A」として特徴付けられた。

－ 155 番目の塩基は「T」として特徴付けられた。

－ 132 番目の塩基は「A」として特徴付けられた。

－ 128 番目の塩基は「T」として特徴付けられた。

－ 124 番目の塩基は「C」として特徴付けられた。

－ 122 番目の塩基は「C」として特徴付けられた。

－ 119 番目の塩基は「C」として特徴付けられた（但し、1 例で「T」が、2 例で「C」及び「T」の両者が検出された）。

（2 b 型）：

2 b 型と判定された全 26 例において、－ 167 番目の塩基は「T」、－ 163 番目の塩基は「G」及び－ 161 番目の塩基は「A」であった。

これら 26 例全例は、岡本法での型判定結果と一致していた。

－ 159 番目の塩基は「A」として特徴付けられた。

－ 155 番目の塩基は「T」として特徴付けられた。

－ 132 番目の塩基は「A」として特徴付けられた。

－ 128 番目の塩基は「T」として特徴付けられた。

- 1 2 4 番目の塩基は「T」として特徴付けられた。
- 1 2 2 番目の塩基は「C」として特徴付けられた。
- 1 1 9 番目の塩基は「T」として特徴付けられた。

(3 a 型) :

この290例において3 a 型と判定されたサンプルはなかった。

(タイプ1 + 2 b 型) 混合 :

この2例においては、- 1 6 7 番目の塩基として「T」、- 1 6 3 番目の塩基として「A」及び「G」、- 1 6 1 番目の塩基として「A」及び「G」、- 1 5 9 番目の塩基として「A」及び「C」、- 1 5 5 番目の塩基として「C」及び「T」、- 1 3 2 番目の塩基として「A」及び「G」、- 1 2 8 番目の塩基として「A」及び「T」、- 1 2 4 番目の塩基として「C」及び「T」、- 1 2 2 番目の塩基として「C」及び「T」、- 1 1 9 番目の塩基として「A」及び「T」をそれぞれ検出した。

上記より表1に従い(タイプ1 + 2 b 型)の混在型と判定され、これは岡本法での型判定結果に一致していた。

以上より、HCVの5' - NCRの- 1 6 7 番目、- 1 6 3 番目及び- 1 6 1 番目の塩基情報に基づけば、HCV遺伝子型のタイプ1並びにサブタイプ2 a、2 b 及び3 aの区別乃至同定が極めて簡便に行えることがわかった。

また、上記タイプ1は、この5' - NCRの- 9 9 番目の塩基情報に基づけば、サブタイプ1 a 及び1 bの区別乃至同定を行えることがわかった。

更に、この5' - NCRの- 1 5 9 番目、- 1 5 5 番目、- 1 3 2 番目、- 1 2 8 番目、- 1 2 4 番目、- 1 2 2 番目及び- 1 1 9 番目の塩基は、同様にそれぞれの遺伝子型に特徴的であり、必要に応じてこれらの少なくとも一つの塩基情報を更に参照することにより、よりの確な遺伝子型判定が可能であることがわかった。

これら本発明にかかる塩基情報と遺伝子型との関連は表1に示されるとおりで

ある。また、以上の試験結果の纏めを下記表 2 ～ 表 4 に示す。

表 2 本発明の遺伝子型判定結果と岡本法による型判定結果の対比

		本発明遺伝子型判定				合計
		タイプ 1	2 a	2 b	タイプ 1 + 2 b	
岡 本 法	1 b	2 2 0	0	0	0	2 2 0
	2 a	0	4 1	0	0	4 1
	2 b	0	0	2 6	0	2 6
	1 b + 2 a	0	1	0	0	1
	1 b + 2 b	0	0	0	2	2
合 計		2 2 0	4 2	2 6	2	2 9 0

表 3 本発明の遺伝子型判定結果と群別測定（セログルーピング）との対比

		本発明遺伝子型判定				合計
		タイプ 1	2 a	2 b	タイプ 1 + 2 b	
群 別 測 定	1	1 9 3	1	2	1	1 9 7
	2	2	3 5	1 5	0	5 2
	Untyped	2 5	6	9	1	4 1
合 計		2 2 0	4 2	2 6	2	2 9 0

表 4 本発明の遺伝子型判定結果とウイルス量（KIU/ml）との対比

ウイルス量 (KIU/ml)	本発明遺伝子型判定				合計
	タイプ 1	2 a	2 b	タイプ 1 + 2 b	
< 0. 5	5	1	0	0	6
0. 5 < 1 0 0	4 0	1 9	4	0	6 3
1 0 0 < 5 0 0	1 4 3	1 8	9	2	1 7 2
5 0 0 < 8 5 0	2 6	3	1 0	0	3 9
8 5 0 <	6	1	3	0	1 0
合 計	2 2 0	4 2	2 6	2	2 9 0

尚、表 3 において、群別測定は市販キット（イムチェック・F-HCV GR

「コクサイ」；国際試薬（株））に従い実施した。また群別測定「Untyped」は、同法による判定不能例（グループ1の抗体もグループ2の抗体も検出できなかった例）及び判定保留例（グループ1の抗体とグループ2の抗体の両者が検出され判定できなかった例）を示す。

該表3より、群別測定では、290例中41例で判定不能又は判定保留となり、治療指針となる群別判定情報ができなかったのに対し、本発明の遺伝子型判定ではより多くのサンプルで当該情報を得ることができることが分かる。

また、表4より、290例中6例でウイルス量の定量が0.5 (KIU/ml) 未満となったが、これらサンプルにおいても本発明の遺伝子型判定が可能であり、本発明の判定方法はウイルスの検出面においても高感度であり有用と考えられた。

産業上の利用可能性

本発明のHCVの遺伝子型判定方法によれば、HCVの5'-NCRの塩基情報に基づき、HCV遺伝子型1（1a及び1b）、2a、2b及び3aが確実に判定でき、しかも簡便な操作及び短時間で、臨床検体中のHCV-RNAの定量と遺伝子型の判定を行うことができる。従って、本発明のHCVの遺伝子型判定方法を用いることにより、C型肝炎の進行程度や肝硬変又は肝癌への移行率、症状の特徴等に関する解析、インターフェロンによる治療効果の予測等が可能となり、個々の患者に合った治療方針の決定に大きく寄与する。

請求の範囲

1. C型肝炎ウイルス遺伝子の5' 非翻訳領域の少なくとも-167位、-163位及び-161位の塩基を決定し、当該塩基情報に基づいて遺伝子型のタイプ1並びにサブタイプ2a、2b及び3aを判定することを特徴とするC型肝炎ウイルスの遺伝子型判定方法。

2. C型肝炎ウイルス遺伝子の5' 非翻訳領域の少なくとも-99位、-167位、-163位及び-161位の塩基を決定し、当該塩基情報に基づいて遺伝子型のサブタイプ1a、1b、2a、2b及び3aを判定することを特徴とするC型肝炎ウイルスの遺伝子型判定方法。

3. C型肝炎ウイルス遺伝子5' 非翻訳領域の-159位、-155位、-132位、128位、-124位、-122位及び-119位からなる群から選ばれる少なくとも1つの塩基情報を更に参照するものである請求項1又は2記載の判定方法。

4. C型肝炎ウイルス遺伝子の5' 非翻訳領域のPCR増幅産物を用いて遺伝子型を判定するものである請求項1～3のいずれか1項記載の判定方法。

5. PCR増幅産物が、C型肝炎ウイルス-RNA定量的測定法のPCR増幅産物である請求項4記載の判定方法。

6. 配列番号1の塩基配列からなるプライマーを用いる直接塩基配列決定法によって塩基配列を決定するものである請求項1～5のいずれか1項記載の判定方法。

7. 配列番号1の塩基配列からなるプライマー。

8. 検体中のHCV-RNA量とその遺伝子型の情報を与えるための方法であって、以下の工程（イ）～（ロ）：

（イ）C型肝炎ウイルス遺伝子の5' 非翻訳領域をPCR法によって増幅し、C型肝炎ウイルス-RNA量を定量する工程、

(ロ) 工程 (イ) で調製された P C R 増幅産物を精製する工程、及び
(ハ) 工程 (ロ) で精製された P C R 増幅産物の塩基配列を決定し、C 型肝炎ウイルス-R N A の遺伝子型を判定する工程、
を含むことを特徴とする C 型肝炎ウイルスの遺伝子型判定方法。

9. 工程 (イ) で調製される P C R 増幅産物が、C 型肝炎ウイルス遺伝子の 5' 非翻訳領域の - 2 7 4 番から - 3 1 番の塩基配列からなる D N A 断片である請求項 8 記載の判定方法。

1 0. 工程 (イ) で調製される P C R 増幅産物を鋳型としてその領域内に設定したプライマーを用いて更に P C R 増幅するものである請求項 8 又は 9 記載の判定方法。

1 1. 工程 (ロ) の精製が、ガラス担体を用いたカラムクロマトグラフィーにより行われるものである請求項 8 ~ 1 0 のいずれか 1 項記載の判定方法。

1 2. 工程 (ハ) の塩基配列の決定が、直接塩基配列決定法により行われるものである請求項 8 ~ 1 1 のいずれか 1 項記載の判定方法。

1 3. C 型肝炎患者から採取された C 型肝炎ウイルスを含むサンプルを用いて、以下の工程 (イ) ~ (ロ) :

(イ) C 型肝炎ウイルス遺伝子の 5' 非翻訳領域を P C R 法によって増幅し、C 型肝炎ウイルス-R N A 量を定量する工程、

(ロ) 工程 (イ) で調製された P C R 増幅産物を精製する工程、及び

(ハ) 工程 (ロ) で精製された P C R 増幅産物の塩基配列を決定し、C 型肝炎ウイルス-R N A の遺伝子型を判定する工程、

を行うことを特徴とする当該 C 型肝炎患者におけるインターフェロン治療効果の予測方法。

SEQUENCE LISTING

<110> Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Genotype Determination of Hepatitis C Virus

<130> OP0033

<150> JP P1999-363869

<151> 1999-12-22

<150> JP P1999-363871

<151> 1999-12-22

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 22 -

<212> DNA

<213> geno 7 primer

<400> 1

ggagagccat aglggctgc gg 22

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> geno 5 primer

<400> 2

gaaagcgtct agccatggcg 20

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> geno 6 primer

<400> 3

ctatcaggca gtaccacaag gc 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09144

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kazuhiko KATAYAMA et al., " HCV5' Hi Honyaku Ryouiki (5'NCR) no Kouji Kouzou to Kinou no Kaiseki " Nippon Rinshou Vol.53, 1995, Supplement issue, pp.43-50	1-6
A	JENS BUKH, "Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1992) Vol.89, pp.4942-4946	1-6
X	JP, 11-103899, A (Tokyo Rinshou Igaku Sogo Kenkyusho), 20 April, 1999 (20.04.99), Sequence No.1 (Family: none)	7
X	JP, 6-121700, A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 06 May, 1994 (06.05.94), Sequence Nos. 5,7 (Family: none)	7
X	Sandrine Castelain et al., "Direct blotting electrophoresis for sequencing and genotyping hepatitis C virus" Journal of Virological Methods, (1997) Vol.65, No.2, pp.237-243	8-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
15 February, 2001 (15.02.01)Date of mailing of the international search report
06 March, 2001 (06.03.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09144

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Moritoshi KINOSHITA et al., "RNA Standard Kyougou Teiryoku hou (CRT-PCR hou) no Koso teki Kentou", Igaku to Yakugaku (February 1999) Vol.41, No.2, pp.325-329	8-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁷ C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	片山和彦他, 「HCV 5' 非翻訳領域 (5' NCR) の高次構造と機能の解析」日本臨牀 53巻 1995年増刊号 第43-50頁	1-6
A	JENS BUKH, "Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1992) Vol. 89, p4942-4946	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.02.01

国際調査報告の発送日

06.03.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子

4N 9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 11-103899, A (財団法人東京都臨床医学総合研究所) 20. 4月. 1 999 (20. 04. 99) 配列番号 1 (ファミリーなし)	7
X	JP, 6-121700, A (中外製薬株式会社) 6. 5月. 1994 (06. 05. 94) 配列番号 5, 7 (ファミリーなし)	7
X	Sandrine Castelain et al. "Direct blotting electrophoresis f or sequencing and genotyping hepatitis C virus" Journal of Virological Methods, (1997) Vol. 65, No. 2, p. 237-243	8-13
Y	木下 盛敏 他, "RNAスタンダード競合定量法 (CRT-PCR 法) の基礎的検討", 医学と薬学 (1999年2月) Vol. 41, No. 2 p. 325-329	8-13